

Selective amplification of target polynucleotide sequences.

Publication number: JP2501532 (T)

Publication date: 1990-05-31

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: C12N15/09; C07H21/04; C12N15/69; C12P21/00; C12Q1/68;
G01N33/53; C12N15/09; C07H21/00; C12N15/67; C12P21/00;
C12Q1/68; G01N33/53; (IPC1-7): C12N15/10; C12P21/00;
C12Q1/68

- European: C12N15/69; C12Q1/68D8; C12Q1/68M; C12Q1/68M10D;
G01N33/53F

Application number: JP19880507108 19880729

Priority number(s): US19870080479 19870731

Also published as:

- JP2774121 (B2)
- EP0310229 (A1)
- EP0310229 (B1)
- WO8901050 (A1)
- PT88168 (B)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 2501532 (T)

Abstract of corresponding document: EP 0310229 (A1)

A method is provided for multiplying the number of copies of a target polynucleotide sequence comprising a series of primer hybridization, extending, and denaturing steps to provide an intermediate double-stranded DNA molecule containing a promoter sequence (through the use of a promoter-sequence-containing primer) incorporated upstream from the target sequence. The double-stranded DNA intermediate is then used to grow multiple RNA copies of the target sequence. The resulting RNA copies can be used as target sequences to produce further copies. Multiple cycles of this sort can thereby exponentially increase the number of target sequence copies.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

⑫ 公表特許公報 (A)

平2-501532

⑬ 公表 平成2年(1990)5月31日

⑭ Int. Cl.⁵
C 12 N 15/10
C 12 Q 1/68識別記号
ZNA A
序内整理番号
6807-4B
8717-4B審査請求 未請求
予備審査請求 未請求
部門(区分) 1 (1)
A※
(全 10 頁)

⑭ 発明の名称 標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅

⑬ 特願 昭63-507108

⑬ 翻訳文提出日 平1(1989)3月30日

⑬ ⑭ 出願 昭63(1988)7月29日

⑬ 國際出願 PCT/US88/02601

優先権主張 ⑬ 1987年7月31日 ⑬ 米国(US)⑬ 080,479

⑬ 國際公開番号 WO89/01050

⑭ 発明者 バーグ, ローレンス ジェームス アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404, フォスター シティ

⑭ 出願人 ザ ボード オブ ト拉斯ティーズ オブ ザ リーランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティ

⑭ 代理人 弁理士 青木 朗 外4名

⑭ 指定国 AU, DK, FI, JP, KR, NO

最終頁に続く

請求の範囲

1. 反応媒体中で標的ポリヌクレオチド配列のコピー数を増加せしめる方法であって、

(1) 標的単鎖ポリヌクレオチド分子を複数のプライマー配列とハイブリダイズせしめ、次に該プライマーを延長しそして変性せしめ、ここで前記プライマーの内の少なくとも1つはプロモーター配列であり、こうして標的配列の上流にプロモーター配列を有する二本鎖DNA中間体を生成せしめ；そして

(2) 前記プロモーターに結合することができるRNAポリメラーゼを用いて前記中間体から前記標的配列の多数のRNAコピーを一増殖せしめる；

ことを含んで成る方法。

2. (1) 前記RNAコピーをプライマー配列とハイブリダイズせしめ、延長しそして変性せしめることにより該RNAコピーから前記標的配列の上流にプロモーター配列を有する二本鎖DNA中間体の第二の集合を調製し；そして

(2) 前記二本鎖DNA中間体の第二の集合から多数のRNAコピーを増殖せしめる；

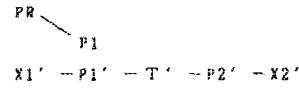
ことをさらに含んで成る、請求項1に記載の方法。

3. 前記の延長が、前記反応媒体を逆転写酵素と接触せしめることを含んで成る、請求項1に記載の方法。

4. 二本鎖標的分子のアンチーセンス鎖を、5'にプロモーター配列を有しそして該標的配列5'側の標的センス鎖の

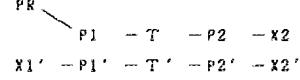
配列と同等の結合配列を有する第一プライマーとハイブリダイズせしめ、前記アンチーセンス鎖を錆型として用いて前記第一プライマーから第一相補鎖を延長せしめ、変性せしめることによって単鎖ポリヌクレオチド中間体の第一の集合を形成し、該第一の集合を前記センス鎖中の前記標的配列の3'端に結合する第二プライマーとハイブリダイズせしめ、前記第一相補鎖を錆型として用いて前記第二プライマーから相補鎖を延長することによって前記二本鎖DNA中間体を得、そして前記反応媒体を前記プロモーターと結合することができるRNAポリメラーゼと接触せしめる、ことを含んで成る請求項1に記載の方法。

5. (1) 配列X1'-P1'-T'-P2'-X2'の標的分子に相補的な配列X1'-P1'-T'-P2'-X2'の単鎖ポリヌクレオチド分子を配列PR-P1の第一プライマーとハイブリダイズせしめることにより、



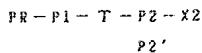
を生成せしめ；

(2) 相補鎖を延長することによって、



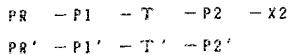
を生成せしめ、次に変性を行って単鎖ポリヌクレオチドの第一の集合を形成せしめ；

(3) 前記ポリスクレオチドの第一の集合を配列P2'の第二プライマーとハイブリダイズせしめることにより、



を生成せしめ；

(4) 相補鎖を延長することにより、



を生成せしめ；そして

(5) 二本鎖プロモーター領域、



と結合することができるRNAポリメラーゼを用いて式R1''-T''-P2''を有するP1-T-P2の多数のRNAコピーを増殖せしめること；

ことを含んで成る、

(前記式中、

Tは、標的配列であり；

T'は、Tに対して相補的な配列であり；

PR-P1は、第一オリゴヌクレオチドプライマーであって、ここでPRはプロモーター配列を含んで成り、そしてP1は該第一プライマーの結合配列であり；

R1'は、P1に対して相補的な配列であり；

PR'は、PRに対して相補的な配列であり；

P2'は、第二オリゴヌクレオチドプライマーであり；

を生成せしめ；

(9) 相補鎖を延長することにより、



を生成せしめ；

(10) 段階(5)を反復し；そして

(11) 場合によっては段階(6)～(10)を反復する；

(ここで、段階(6)～(10)の各サイクルにおいて、各PR-P1及びP2'オリゴヌクレオチドプライマーは段階の先行するサイクルからの対応するプライマーであるか又は対応するプライマーとは異なるプライマーである)

段階をさらに含んで成る、請求項5に記載の方法。

7. 前記標的単鎖ポリスクレオチド分子がRNAである、請求項5に記載の方法。

8. 前記標的単鎖ポリスクレオチド分子がDNAである、請求項5に記載の方法。

9. 前記延長が、延長されるべき前記配列を逆転写酵素と接触せしめることを含んで成る、請求項5に記載の方法。

10. 前記RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼである、請求項5に記載の方法。

11. 前記プライマーが10～30ヌクレオチドの長さの結合配列を含んで成る、請求項1に記載の方法。

12. 前記複数のプライマーが200未満の塩基対により分離されている、請求項1に記載の方法。

13. 前記プロモーター配列がプライマーの5'～末端にあ

P2は、P2'に対して相補的な標的ポリヌクレオチド中の配列であり；

X1及びX2は、前記標的分子のP1-T-P2配列の外側の配列であり、そしてそれぞれ存在し又は存在せず；

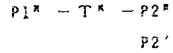
X1'は、X1に対して相補的な配列であり；

X2'は、X2に対して相補的な配列であり；そして

P1''-T''-P2''は、RNA分子であり、ここでP1''はP1と同等な配列であり、T''はTと同等な配列であり、そしてP2''はP2と同等な配列である)

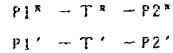
請求項1に記載の方法。

6. (6) 次P1''-T''-P2''の前記多數のRNAコピーを前記第二プライマーとハイブリダイズせしめることにより、



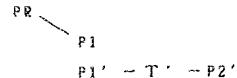
を生成せしめ；

(7) 相補鎖を延長して、



を生成せしめ、次に変性を行って単鎖ポリスクレオチドの第三の集合を形成せしめ；

(8) 前記単鎖ポリスクレオチドの第三の集合を前記第一プライマーとハイブリダイズせしめることにより、



を生成せしめ；

14. 前記標的単鎖ポリスクレオチド分子がDNAであり、延長が逆転写酵素を用いて行われ、そして前記プライマーが前記中間体中に150塩基対以下離れて存在する、請求項1に記載の方法。

15. サンプル中の標的ポリスクレオチド配列を検出する方法であって、

請求項1に従って該標的配列のコピー数を増加せしめ；そして

前記増加したコピーの存在を検出する；ことを含んで成る方法。

標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅

発明の分野

本発明は、遺伝子自体の検出のため又は遺伝子を含有する生物体の検出のために特定の遺伝子の存在を検出する診断測定に關し、そして特に検出工程に先立って検出されるべき遺伝子のコピー数を増加せしめる技法に向けられる。本発明はさらに、特定のポリヌクレオチド配列の多くのコピーを必要とするあらゆる方法に関する。

発明の背景

サンプル中の分析対象、例えば細菌、ウイルス又は遺伝欠陥を示すものとしての特定のDNA又はRNA配列の存在の検出に頼る多数の診断測定が開発されている。幾つかの例においては、診断に使用できる遺伝子は、ハイブリダイゼーション、特異的抗体との反応、又は他の方法のいずれかにより直接検出するのに十分な量で存在する。しかしながら、注目の遺伝子が少量存在するか、又はサンプル中の類似の配列により惹起されるバックグラウンドが十分に高い場合には、標的にされる遺伝子の確実で鋭敏な検出が困難である。不明瞭な結果は診断試験において満足できるものではない。

この様な診断目的の感受性及び特異性を増加せしめるための種々の方法が開発されている。有効ではあるがしかし長時間

480万コピーを得るのに25サイクルが必要である。

このポリメラーゼ連鎖反応は非常に鋭敏で且つ有望な方法であるが、この技法に内在する幾つかの限界及び欠点が存在する。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応の各サイクルは最も良くてもわずか2倍の増幅をもたらし、そしてそれ故に実質的な増幅を達成するために多数のサイクル(20~30)が必要である。さらに、各PCRサイクル中に生ずる高温熱性が使用される酵素を不活性化し、そしてそれ故に高価な酵素の反復添加を必要とする。

従って、遺伝子増幅の速度を上昇せしめる技法(従って、より少い酵素及びより少いサイクル数で足りる)は、特定の標的核酸配列の検出を含むすべての診断法及び増加した数の特異的に増幅されたポリヌクレオチド(DNA又はRNA)を必要とするあらゆる方法のために、非常に有利であろう。

関連文献

PCR法は、Saiki等、“ β グロビンゲノム配列の酵素的増幅及び雄性赤血球貧血の制限部位分析”、*Science*(1985)230:1350~1354; Saiki等、“酵素的に増幅された β -グロビン及びHbA-D α -DNAの対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ”、*Nature*(1986)321:163~166; 並びにScharf等、“酵素的に増幅されたゲノム配列の直接クローニング及び配列分析”、*Science*(1986)233:1076~1078、を含む多数の刊行物に記載されている。さらに、3件の米国特許出願、すなわち1985年3月28日出願の出願No716,975、

特表平2-501532(3)

間を要する技法である細胞培養による標的の増幅が長い間唯一の確実な方法であった。他の技法は、標的と結合するであろうプローブに付加された鋭敏なレポーター基を用いて検出系の感度を上昇せしめる。鋭敏なレポーター基の例には放射性分子及び蛍光分子が含まれるであろう。プローブと連結された酵素、例えばバーオキシダーゼ又はアルカリ性ホスファターゼもまた基質発色物質に対するそれらの触媒作用を通して感受性を改良する。増加した感受性はまた、レポーター基の増幅によっても得られる。この様な増幅はまたアビシン-ビオチン相互作用、核酸とのネットワーク形成、又はRNAレポーター基の直接的酵素的複製により達成されている。この後者の技法は約12分間に1,000,000コピーまでのRNAを生じさせる。他の技法は検出系で使用されるレポーター基ではなく標的核酸配列を増幅する。

標的核酸配列の増幅のための1つの方法はポリメラーゼ連鎖反応又はPCR技法として知られており、そして遺伝的欠陥を担当する遺伝子を検出するために開発されている。この方法は、標的DNAの変性、プライマーアニーリング及びDNAポリメラーゼによる延長の反復サイクルにおいて特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用する。1つのプライマーから生じた延長生成物が他のプライマーのための追加の標的配列として使用される。標的配列の増幅の程度は行われるサイクル数により制御され、そして理論的には簡単な式 2^n (nはサイクル数)により計算される。サイクル当たりの平均効率が約65%~85%である場合、標的配列の30万~

1985年10月10日出願の出願No791,308、及び1986年2月7日出願の出願No828,144に基く優先権を主張する、1986年12月10日に公表されたヨーロッパ特許出願No0200362 A2(出願No86302298-4)を参照のこと。

発明の概要

本発明は、標的酵素からコピーを作る2つの方法を交互に用いることによる標的ポリヌクレオチド配列のコピー数を迅速に増加せしめる(酵素的サイクルにより)方法を提供する。第一の一連の段階において、プロモーターを含んで成る中間体二本鎖ポリヌクレオチドが生成され、次に標的配列が生成される。次に第二工程において、この二本鎖中間体を使用することにより、該二本鎖中間体のプロモーター領域に結合するRNAポリメラーゼを用いて多数のRNAコピーを調製する。次に、逆転写酵素を用いて二本鎖プロモーター含有中間体の第二の(又はさらなる)集合を調製することにより、他の増幅サイクルを開始するために各RNAコピーが標的配列として使用され得る。従って本発明の方法は、サンプル中に存在する標的ポリヌクレオチド配列のコピー数を、従来法より迅速にインピットロで増加せしめる方法を提供する。この方法は、特定の具体的な例において、トキソプラズマ・ゴンダリ- (*Toxoplasma gondii*)についての診断測定に適用される。

図面の簡単な説明

本発明は、図面と共に以下に記載する具体的な説明により、

一層よく理解されるであろう。

図は、本発明の方法の異なる段階において存在するポリヌクレオチドを示す模式図である。

具体的な構造の記載

本発明は、様的オリゴヌクレオチド配列のコピー数を増加せしめる方法を提供し、そしてそれ故にサンプル中に少量存在する特定のポリヌクレオチド配列を認識することを意図する診断測定において特に有用である。これはまた、特定の配列のポリヌクレオチドの迅速な生成により利益を受ける任意の方法において有用である。

様的ポリヌクレオチド配列はより大きな分子の部分であることができ、又は特定の配列が核酸全体を構成するようにはじめから個別分子として存在することもできる。増幅されるべき様的細胞が最初に純粋な形で存在する必要はない。これは複雑な混合物の微小部分、例えば分析されるべき特定の生物学的サンプルのごくわずかな部分を構成する特定の微生物の核酸配列の部分であることができる。

ポリヌクレオチドを含有する出発反応混合物は所望により1種類より多くの様的配列を含有することができる。従って、本発明の方法は、1種類の特定のポリヌクレオチド様的配列を多量に生産するためのみではなく、同一又は異なるポリヌクレオチド分子上に位置する1種類より多くの異なる様的配列を同時に増幅せしめるためにも有用である。複数の様的配列が存在する場合、本発明の必要な唯一の変更は、所望の様的配

列のそれぞれのためにプライマー（後で検討する）を提供することである。

本発明の方法により任意の特定のポリヌクレオチド様的配列を増幅することができる。後記のように2つのオリゴヌクレオチドプライマーを調製することができるよう十分に、配列の両末端における十分な数の核酸が知られることのみが必要である。配列の両端の塩基についての知識が多くなるに従って、様的配列に対するプライマーの特異性が高くなり、そしてそれ故にこの方法の効率が高くなる。増幅されるべき様的の一端又は両端の配列に関する情報が幾分不明瞭である場合は特に、本明細書において使用するプライマーなる語は複数のプライマーを意味することができると理解されよう。例えば、核酸配列が既知の蛋白質配列から推定される場合、遺伝コードの縮意に基づくすべての可能性あるコドンの変化を代表する配列を含有するプライマーの集合が各鎖について使用されるであろう。この集合の1つのプライマーは様的配列の末端と相同である。

この方法は、様的配列を含有しそしてさらに様的配列の上流に位置するプロモーターを含有する二本鎖ポリヌクレオチド中間体を調製することにより開始する。この二本鎖中間体は、短いオリゴヌクレオチドをプライマー配列として使用しそして該プライマーが結合するより長いポリヌクレオチド鎖を錆型として使用して該プライマーを延長することにより調製される。相補的様的鎖は単鎖状態（すでにこの形で存在しなければ）で得られ、そして相補鎖中の様的領域の5'末端

又はその近傍の相補鎖中領域に相補的な結合配列から上流のプロモーター配列を含有するオリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズする。このプライマー中の結合配列は、コピーされるべき特定の様的配列への5'又は様的配列の5'末端に存在する様的ポリヌクレオチド分子中の配列と実質的に同等である。このプライマーは、もとの様的鎖と同じ意味のDNA分子の、DNAポリメラーゼ（例えば逆転写酵素）を用いる合成を開始するために使用される。

次に、この新しく合成された鎖に第二のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする。この第二のオリゴヌクレオチドプライマーは様的分子の3'一末端に対応する領域に相補的である。プライマー領域間のヌクレオチドの数は好ましくは300未満、さらに好ましくは200未満であり、しかし10より多く、さらに好ましく15より多い。第二プライマーが延長される場合、様的配列のコピー及び第一プライマーが生成する。従って、得られる生成物は、本発明の方法の第一の部分を構成する様的配列への5'のプロモーター領域を含有する。

次に、中間体プロモーター含有二本鎖ポリヌクレオチドは中間体中に形成されたプロモーター領域に結合することができるDNA依存性RNAポリメラーゼの錆型として使用される。このポリメラーゼ酵素は様的配列をコピーし、これによってプロモーターから下流の様的配列の多数のRNAコピーを提供する。生産されるコピー数はプロモーター、使用されるRNAポリメラーゼ及び反応条件に依存し、しかし10コピーは容易に生産され、そして強力なプロモーター、活性RN

Aポリメラーゼ及び適当な反応条件を選択することにより100コピー以上を生産することができる。

RNAコピーのそれぞれは、特定の様的の追加のコピーの生産のための錆型として使用することができる。上に使用した第二オリゴヌクレオチドとの反応、相補的配列をもたらすプライマーの延長、第一プライマーとの反応及び生ずるハイブリドの両方向への延長（第一プライマーは様的コピーの生産のためのプライマーとして働き、そして相補鎖の3'一末端はプロモーター領域のコピーが作られるようにプライマーとして働く）が、RNAコピーを調製するための錆型として使用された上記の類似の二本鎖プロモーター含有中間体を生産するであろう。次に、プロモーター依存性RNAポリメラーゼを用いるRNA生産サイクルを反復することができる。サイクル当たりわずか10個のRNAコピーが生産されれば、3サイクルが反応媒体中に存在する様的配列数の一千倍の増加をもたらすであろう。錆型当たり100コピーのRNAが生産されれば、3サイクルにより100万コピーの様的配列が生産されるであろう。

上記の方法は、様的鎖と該様的鎖に対する相補鎖とを含んで成る二本鎖ポリヌクレオチド様的か、又は最初の様的がRNAのごとき単鎖である場合には相補的様的鎖の存在を仮定している。様的が最初に単鎖RNA又はDNAであれば、相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを用いて上記の方法と同様の方法で調製することができる。例えば、上記の第二オリゴヌクレオチドプライマーは様的分子の3'一末端に対

応する領域に相補的である。この第二オリゴヌクレオチドプライマー、又は標的配列への3'の異なる領域に対して相補的な異なるプライマーを用いて、方法の第一段階において使用される相補鎖を調製することができる。他の変法は、標的鎖（その相補鎖ではなく）に対して相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて開始することである。次にプロモーター配列含有プライマーを、第一プライマーから延長される相補鎖にハイブリダイズせしめる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、増幅されるべき各特定の配列の異なる鎖に対して「実質的に」相補的であるように選択される。このことは、プライマーがそれらの対応する鎖とハイブリダイズするために十分に相補的でなければならないことを意味する。従って、プライマーはそれが結合する錠型の正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片をプライマーの5'一末端に付加し、プライマー配列の残りの部分が錠型鎖と相補的であるようにすることができる。言うまでもなく、上記のように、1つのこのような非相補的ヌクレオチド断片は本発明に必要なプロモーター配列であろう。しかしながら、プロモーター配列が存在しない場合でも、他の非相補的ヌクレオチド断片を付加することができる。例えば、制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を提供する配列を提供して、プラスミドへの挿入が容易な増幅された標的配列の調製を可能にすることができます。あるいは、プライマー配列が増幅されるべき鎖（又はその相補鎖）の配列と十分に相補的であってそれとハイブリダイズしそして延長

生成物の合成のための錠型を形成するものであれば、プライマーの結合配列に非相補的塩基を散在せしめることができる。例えば、特定の制限酵素開裂部位を提供するために中程度の長さ（例えば約15ヌクレオチド）中で1個の単一ヌクレオチドを置換することができる。

所望により、両プライマーにプロモーター配列を含めることにより完全サイクルにより生産されるコピー数をさらに増加せしめることができる。

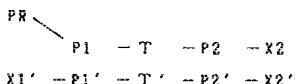
本発明の方法の操作は図及び以下の詳細な記載により容易に理解することができる。図及び以下の検討において示される模式的単鎖及び二本鎖ポリヌクレオチドのために標準的命名法及び方向が用いられる。二本鎖ポリヌクレオチドの上鎖の左端は5'一末端であり、同じ鎖の右端が3'一末端である（矢じりにより示される）。相補鎖は逆向きの方向を有するから下鎖はその3'一末端が左にそしてその5'一末端が右に示される。図を回避するため、二本鎖ポリヌクレオチドの部分として示されていない場合でも下鎖はこの方向で示される。種々の配列が文字及び符号により特定される本明細書（特許請求の範囲を含む）に記載される配列のために同じ約束が適用される。本方法の各段階の生成物のすべてが示されるのではなく、本発明に関連するもののみが示される。

図の第1行には、後の段階でこの分子に対して行われるであろう操作において定義される一連の領域を含む二本鎖標的ポリヌクレオチド分子が示される。前に検討したように、もとの標的単鎖RNA（又はDNA）分子である場合最初の

段階のために二本鎖標的が作られる。ポリヌクレオチドの5'一末端において、後の操作でコピーされないセグメントがX1として特定される。これに続き、後の段階で使用されるプライマーの配列の一部を成す配列P1のセグメントが存在する。コピーされるべき配列である標的配列Tが配列P1に続く。異なるプライマーと結合する配列P2がTの3'一末端に存在する。P2の後に追加のヌクレオチドが存在することがあるが、しかしコピーされない。これらのヌクレオチドは図中でX2と命名される。X1もX2も本発明の操作には必要ではなく、そしてそれ故に場合によっては存在し、0から数百又は数千のヌクレオチドにわたる。アポストローフ又は「プライム」(')は反対鎖に存在する相補的配列を示す。この単鎖標的分子はオリゴヌクレオチドプライマーの存在下で変性され、そして次に第2行に示すようにオリゴヌクレオチドと標的とのアニールを許容するように条件が変えられる。

図の第2行は第一オリゴヌクレオチドプライマーPR-P1を示し、これは複合構造であるがその3'一末端に配列P1を有し変性された標的分子のP1'セグメントにハイブリダイズする。このオリゴヌクレオチドプライマーの5'一部分PRは、その二本鎖構造においてRNAポリメラーゼのための機能的プロモーターを含んで成る配列を含有する。配列PRはこの発明に不都合な影響を与えない追加のヌクレオチドを含有することができる。PR-P1プライマーは適当な酵素（DNA標的のためにはDNA依存性DNAポリメラーゼ、あるいはRNA及び/又はDNA標的のためにはRNA依存性DN

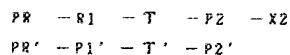
Aポリメラーゼ）により延長され、図の第3行に示されるように鎖PR-P1-T-P2-X2を与える。プロモーター領域の単鎖性は、図においてこの領域の2本の鎖間の接触の不存在により、そして明細書により次の様に示される：



特に自動装置を用いての迅速なハイブリダイゼーション（アニーリング）及び循環を許容するため、本発明のこのプライマー（及び他のプライマー）は好ましくは比較的短かく、すなわち50個以下のヌクレオチドから成る。

図の第3行に示す二本鎖ポリヌクレオチドを変性した後、第4行に示すようにアニーリング条件下で混合物に配列P2'の第二プライマーを添加する。配列P2'はすでに記載した配列P2'同一であり、そしてPR-P1-T-P2-X2のP2セグメントにそれ自体相補的である。

図の第5行は示される錠型上でプライマーを延長することにより得られる生成物を示す。この段階でのプロモーター領域は今や二本鎖であり、そしてそれ故にDNA依存性RNAポリメラーゼの結合のために使用することができる。この明細書において、この二本鎖中間体は次の様に示される。



RNAポリメラーゼにより生産されるコピーが図の第6行に示される。すべてプロモーター領域の下流に由来するコピ

一されたセグメントは $P1^* - T^* - P2^*$ (T は RNA コピーであることを示す) で表わされる。この RNA 分子は、 $P1-T-P2$ と同一であるか、又はわずかに長いかもしくは短い。なぜなら、これは RNA ポリメラーゼによりコピーされる最初のスクレオチドに及びその後に配列 $PR - P1$ のすべてを含むするからである。最初の標的鎖が単鎖 DNA 標的であれば、 $P1^* - T^* - P2^*$ はもとの DNA + RNA ポリメラーゼによりコピーされるプロモーター含有セグメント PR の隙らかの部分又は RNA ポリメラーゼによりコピーされない隙らかのスクレオチドである。

RNA コピーが追加の増幅のために再循されるべき場合、プロモーター含有二本鎖 DNA 中間体の調整について前に検討した段階を反復する。同じプライマー-セグメント $P1$ 及び $P2'$ 又は同じプロモーター-セグメント PR を使用する必要はないが、 $PR - P1$ 及び $P2'$ はすでに入手可能であり、そして変更することなく使用することができる。他のプライマー配列が使用される場合、生ずるコピーは最初のコピーよりわずかに短いか又は長いであろうが、しかしもとの $P1-T-P2$ 配列を維持すべきある特別の必要性又は要望なければ、前記のことは本発明に不都合な影響を与えない。 $P2'$ プライマーとの最初のアニーリング、及びこれに続くプライマーの延長が図の第 7 行目に示される生成物をもたらす。この二本鎖中間体の変性及びプライマー $PR - P1$ とのアニーリングが第 8 行目に示す生成物をもたらす。この中間体は両方向に延長され得る。なぜなら、 $P1$ 配列は錆型として相補鎖を用いるプライ

マーとして機能し、そして相補鎖は錆型として配列 PR を用いるプライマーとして機能するからである。

第 1 行目～第 5 行目により示される段階において使用されたのと同じプライマーがこの段階で使用されれば、生成物は第 5 行目に示されたものと類似しており、上段の範囲のみが異なるであろう。RNA ポリメラーゼにより下方錆型鎖のみが使用されるから、このことはその後の RNA 重合になんらの影響も与えないであろう。異なるプライマー配列が使用されれば、生ずる錆型鎖は使用されるプライマーに依存して長いか又は短いであろう。この段階で使用されるプライマーの少なくとも 1 つがその 5' 一末端において RNA ポリメラーゼのためのプロモーターを示す配列を有するなら、生ずる材料はなお、さらなる増幅が可能であろう。従って、図中の第 9 行目のプロモーター含有二本鎖 DNA 中間体を DNA 依存性 RNA ポリメラーゼと共に使用して多数の RNA コピーを再度生産することができる。

最初に使用したプライマーが、標的分子を含有する DNA 混合物中の意図しない配列とハイブリダイズする場合、サイクルが反復されるときに異なるプライマーを用いることにより利点が達成し得る。例えば、ヒトの流体又は組織サンプル中の細菌又は寄生体感染が検出されるべき場合のように、多くのポリヌクレオチド配列を含有する粗分析対象中で特定の標的核酸が検出されるべき場合、プライマーオリゴヌクレオチドと宿主 DNA とのハイブリダイゼーションが意図しない宿主配列の増幅をもたらし得る。増幅されたバックグラウンド

材料にプロモーター配列が存在するであろうから、標的配列の増加と共に特定のバックグラウンド配列の量の有意な増加が見られる。この問題を回避するため、異なるサイクルの間に異なるプライマー及び／又はプロモーターを用いてバックグラウンドの増幅を防止することができる。例えば、もとのプロモーターの結合領域の近傍の又はそれとオーバーラップする標的配列に属する異なる結合領域 ($P1^*$ 及び／又は $P2'^*$) を第二サイクルで用いることができる。その増幅が望ましくない他のバックグラウンドポリヌクレオチド配列との結合が有在し得るが、同じバックグラウンド物質が増幅されないであろう。連続する対のプライマーは標的分子の相補鎖上に接近して一緒に存在するであろうから、この発明の具体例に従えば、逐次段階において使用されるプライマーはプライマーの重ねセット (nested set) として記載することができる。第二の (及び連続する) サイクルはまた、異なる RNA ポリメラーゼと結合する異なるプロモーター領域 (例えば、 PR^*) を用いることができる。溶液中に存留する第一の RNA ポリメラーゼの分解、及びそれに続く PR^* に結合する第二ポリメラーゼの導入はバックグラウンドコピーではなく標的コピーを増加せしめるであろう。但し、バックグラウンドコピーの追加の群が生ずるかも知れない。さらに、過剰に存在するかも知れない先行するサイクルからのプライマーを所望により除去することができる。プライマーを除去するための適当な技法はそれらを標的から区別する特徴、例えばサイズ、又は標的が二本鎖 DNA として又は RNA として存在する場合に

単鎖 DNA としてのプライマーの存在、に頼る。例えば、ゲルクロマトグラフィーは大きな標的から小さいプライマーを除去し、他方、特異的ヌクレアーゼ又は抗体は二本鎖標的からプライマーを除去するであろう。

異なるプロモーターと共に重ね合わされたセットのプライマー又は異なるプライマーを使用する別として、第一増幅サイクルにおいて所望の標的配列が 50 の係数をもって増加すると仮定しよう。同時に、バックグラウンド配列へのプライマーの結合が生じ、バックグラウンド配列もまた 50 の係数をもって増加する。第二増幅サイクルが重ねプライマーを使用し、そして再び 50 倍の増幅が起これば、標的配列は 2500 倍増加し、他方、(最悪の場合でも) 2 つのバックグラウンド配列がそれぞれ 50 倍増加する。重ねプライマーの 3 サイクルの後、標的の増加係数は 125,000 であり、(最悪の場合でも) 3 つのバックグラウンド配列が 50 倍増加するであろう。

本発明の個々の段階はすべて常用のものであり、そして既知の試薬及び技法を用いて行うことができる。特に設計された試薬はプライマー $PR - P1$ 及び $P2'$ である。しかしながら、これらのセグメントは全合成により、又は天然源からの所望の配列の単離により容易に得ることができる。配列 $P2$ (及び従ってその相補配列 $P2'$) 並びに $P1$ が標的分子中で知られている場合、全合成が最も容易に行われる。プロモーター配列を有する DNA セグメントの全合成は容易に達成される。なぜなら、プロモーター配列自体は公表されているからである。標的分子の配列が未知の場合、標的分子を制限エン

ドスクレアーゼ又は他の方法により断片化し、そしてセグメントを本発明のために選択することができる。RNAポリメラーゼ及びその関連するプロモーター配列はこれらの成分の多くの入手可能な起源から選択することができる。例えば、T7バクテリオファージからのT7 RNAポリメラーゼがニューイングランドバイオラブスから入手可能である。他のRNAポリメラーゼには、ニューイングランド・バイオラブスから入手可能なバクテリオファージSP6からのSP6、又はシグス・ケミカル社、セントルイス、ミズリーから入手可能なE.コリK-12株からのK-12が含まれる。対応するプロモーターは、ポリメラーゼが得られた生物から単離することができ、又は配列が既知の場合には化学的に合成することができる。

本発明の方法において使用される他の生化学試薬にはプライマー配列を延長して二本鎖ポリヌクレオチドを形成することができる酵素が含まれる。この様な酵素には逆転写酵素及び他のDNAポリメラーゼが含まれる。特に好ましい酵素はライフサイエンス社(LifeScience Inc.)からのAMV逆転写酵素又はベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ(Bethesda Research Laboratories)、ファルマシア(Pharmacia)、U.S.バイオケミカルス(U.S. Biochemicals)、又はバイオラブス(Biolabs)からのポリメラーゼI(Klenow)断片である。

本発明の個々の段階は容易に自動化することができる。反応は、单一容器内で逐次試薬を添加しそして必要に応じて条件を変えることによって行うことができる。変性条件は一般に上昇した温度、特に95°Cから100°Cまでの範囲の温度を

用いる。アニーリング及びプライマー延長はさらに低い温度、典型的には35°C～50°Cにおいて起こる。示された高温においてはポリヌクレオチドと共に多くの蛋白質が変性するため、必要に応じて追加の蛋白質を添加することができる。存在する他の試薬は適切なpH及びイオン条件において反応を維持するための緩衝液、並びに延長反応において使用されるべき(検出可能なシグナルを提供するために最終的にラベルされるか又は修飾される)モノヌクレオチドリボスフェートを含むことができる。

二本鎖ポリヌクレオチドを変性するために高温が使用される場合、試薬又は溶液を分離する必要はない。他の変性条件、例えば溶剤の使用は好ましくない。なぜなら、アニーリング条件から変性条件に進む時及びアニーリング条件に戻るときに付加された分離段階が必要だからである。しかしながら、多くの変性、アニーリング及び延長条件が知られており、そして所望により使用することができる。

標的配列の多数のコピーを種々の方法で使用することができる。例えば、本発明の方法を、遺伝子操作法のプラスミド又は他の標的に挿入するための遺伝子の多数コピーを調製するためには使用することができる。標的配列についての診断測定において使用される場合、検出段階(プローブとのハイブリダイゼーション、プローブ、抗体又はリガンド標的が配列T内にあり、すなわちプライマー又はプロモーター領域の部分を含まないのであれば、抗体又は特異的リガンドとの反応)を、反応媒体から增幅された標的を単離することなく行うこ

とができる。領域P1及びP2内のプローブ標的を選択することができるが、プライマー分子との結合又はそれによる妨害を回避するために標的遺伝子コピー(P1-T-P2又はP1*-T*-P2*)の分離が必要であろう。RNAが生産される段階において、ラベルされたリボンドリボスフェート(例えば、放射能ラベル、ビオチン又はアビジンラベル)を使用することもできる。本発明により生じたポリヌクレオチド生成物の他の用途には、変異誘発、遺伝子操作及びクローニング、遺伝分析、治療(遺伝子療法及び化学療法の両者)、蛋白質の生産(インビトロ翻訳及び細胞への導入の両者)、並びに特定のポリヌクレオチド配列の多数コピーを有利に用いる他の任意の方法が含まれる。例えば、RNA制御分子を多量に生産することができる。

今、本発明を一般的に記載したが、本発明の限定を意図することなく例示の目的で与えられる以下の詳細な例に言及することにより一層よく理解されよう。

例

本発明の技法が、トキソプラズマ・ゴンディー(*Toxoplasma gondii*)のクローニングされた遺伝子、具体的には遺伝子B1として同定される35倍反復抗原遺伝子を用いて評価された。示された遺伝子はT.ゴンディー(*T. gondii*)(R.H株)からのゲノムDNAの挿入部を含む組換DNAライプラリーから得られた。このライプラリーは発現ベクター λ gt11中に構成され、そして免疫感作されたラビットからの抗血清を用いてスクリーニングされた。こうして同定された組換体がサブ

クローニングされそしてさらに特徴付けられた。これらの研究において使用された標的遺伝子は、T.ゴンディーのゲノム中でタンデムに多數回反復する2.2キロ塩基対(kb)の部分であることが見出された。この遺伝子の同定及び制限地図は公表されている(Boothroyd等、"Antigen and Tubulin Genes of *Toxoplasma gondii*. Molecular Strategies of Parasitic Invasion, Ayabian"等編、UCLA Symposia Vol. 42, 237-250, Alan Liss、ニューヨーク、1987)。1個の完全反復のヌクレオチド配列が決定されている(しかし公表されていない。)本研究に関連する配列の部分を下に再現する。使用される番号系はゲノム中の反復を規定するEcoRI部位から数える。配列は二本鎖分子として示され、上鎖は左から右に5'→3'方向にある。オリゴヌクレオチドセグメントは同じ意味の鎖、そしてそれ故に同じ配列に下線が付されている。

721
AAAAATGTC GGAATGAAAG AGAGGGCTAAT CTGTTTGCAT AGGTGGACT CACTGACGAC
TTTTTACAC CCTTACTTTC TCTGCCATTA CACAAACGTA TCCAACGTC TGTCACTGCTC
OLIGO 80 OLIGO 81
781
CTCCCTCTG CTGGGGAAAA CTGAAATTC TGACTATCTG TCCAACTTGT GTGTATTC
GAGGGGAGAC GACCCCTTT CACTTTAAGT ACTCATAGAC ACCTTGAAAC CACATAACCG
OLIGO 82
841
ACATTGGCTCG CCTCCCAATCG ATAGTTGACC AGGAACGCTT TAAGGAACAG GAGAAGAAGA
TCTAACCAACGG GGACCTTACG TATCAAACCTGC TGCCTGGCAA ATTCCTGTGTC CCTCTCTCT
OLIGO 83

遺伝子増殖の最終目的是診断測定における本方法の潜在的使用のためであったから、標的遺伝子は、それが診断のための標的遺伝子の必要な残りの基準に合うか否かを見るために試験された。これらは、標的遺伝子が寄生体のほとんど又はすべての株に存在し、他の感染体（特に診断において困る生じさせるもの）のゲノム中に存在せず、そして宿主のゲノム中に検出されないことである。予備的研究が示すところによれば、この遺伝子は試験された寄生体のすべての株に存在し、そしてヒト宿主のゲノムを含む試験された他の生物体のゲノムとの交差反応性は存在しない。

多数のプライマーが本発明の方法における使用のために評価された。これらのプライマーは前記の配列中の下線により特定される。プライマーは20~40スクレオチド（任意のプロモーター配列を含めて）の長さであり、効果的なアーニーリングの標的配列との相容性を示した。グアノシン（G）又はシトシン（C）残基が各プライマーの3'一末端に存在し、そこから延長が起こる効果的な塩基対合を保証した。延長が効率的で且つ迅速であるように、反対の鎖に対して相補的なプライマー間に150以下の塩基対を伴うプライマーを選択した。他のプライマーとの又は単一のプライマーの中で安定な塩基対構造を形成する（これはプライマーが標的配列にアリールするのを防止するであろう）能力を欠くプライマーをさらに選択した。増幅段階のために本質的ではないが、「内部」増幅されたDNAについてのプローブ（すなわち、増幅された生成物に対して特異的であるがプライマーとハイブリダイズし

ゴ#1及び#2を用いて増幅されたDNAは117bpであり、オリゴスクレオチドに対する相容性を含む標的の97bpよりも20bp大である（そして同様に、#1及び#3を用いれば生成物は151bp=131bp+20bpである）。

これらの追加された配列はT7 RNAポリメラーゼのための効率的にプロモーターとして機能した。インビトロT7転写反応はT7 RNA供給者の指示に従って行われた。DNA錠型（プロモーター領域を含む）は上記の反応からさらに処理することなく直接得た。インビトロで生成したT7 RNA転写物のオートラジオグラムは、それらがDNA錠型よりも17スクレオチド短いことを確認した。言い換えれば、151塩基対の二本錠DNA中間対生成物は134nt RNA、すなわち標的配列からの131nt及びT7プロモーター配列からの3nt(GGG)を与えた。RNA転写物に [³²P]-UTPを導入することにより、臭化エチジウム染色に比べて、増幅された生成物の検出感度の約300倍の増加が得られた。

本発明の測定は特に、高い非活性、低いRNA収量を与えるように設計され、そしてそれ故にT7転写から生じた標的配列の最大モル増加を示さない。しかしながら、高収量条件のもとでは、T7 RNAポリメラーゼはDNA錠型分子当たり50~100 RNA分子を生産することが知られている（Davanloo等、"Cloning and expression of gene for the bacteriophage T7 RNAポリメラーゼ"、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1984) 81: 2035~2039）。

この方法は、図に示しそして上に記載したT7RT増幅の幾つ

ないであろうプローブ）のクローニング及び作製を促進するために便利な制限部位を挟むようにプライマーを選択した。この「内部」増幅されたDNAは一般的記載及び請求の範囲中のセクションTと同等である。

T7 RNAポリメラーゼプロモーターを含む二本錠断片の生成のために使用される反応条件はすでに記載されているもの（Saiki等、*Nature*(1986), 324: 163-166）と類似した。反応媒体は100μl容器中に1.0 mM Tris(pH 7.5)、1.0 mM MgCl₂、1.5 mM dNTP、1.5 μMオリゴスクレオチドプライマー、及び実験に応じて種々の量の標的含有DNA(0.15pg~1.0 μg)を含有した。各サイクルは90°Cにおける2分間の変性（変性が1.0分間起こる第一サイクルを除く）、ドライアイス上で5秒間の迅速冷却、回転（チューブの上部での凝集を除去するため）、35°Cにて2分間のプライマーのアーニーリング、E. coliのT7 RNAポリメラーゼ1のXlenow断片2ユニットの添加、及び35°Cにて2分間の延長から成る。

本発明の方法はまた、標的遺伝子特異的オリゴスクレオチドの1つ（上に特定したオリゴ#1）の5'一末端にバクテリオファージT7のRNAポリメラーゼのためのプロモーターを含有せしめることにより行われた。T7プロモーター配列はTAATACGACTCACTATAGGGである。これらの追加の20スクレオチドを最初の段階の増幅された二本錠DNA生成物に導入することにより、この配列を欠くオリゴスクレオチドが使用された場合より20bp大きい生成物を得た。例えば、オリ

かのサイクルを用いて行われた。この方法をここでは便宜上T7RT法と称する。この方法は従来技術のPCR法に比べて幾つかの利点を有する。第一に、増幅されるべき標的配列はRNA又はDNAのいずれでもよく、このことは、選択された遺伝子が高度に発現される場合に重要である。なぜなら、AMV逆転写酵素はRNA又は単鎖DNAを錠型として使用することができるからである。これはまた、レトロウイルスの検出の場合のように標的配列がRNAのみである増幅のために有意味である。第二に、両配列を含む各全サイクルからの増幅はPCR法よりも高く（T7RTについてはサイクル当たり100まであり、これに対してPCR法についてはサイクル当たり最大2である）、サイクル数の減少（T7RTでは3サイクルで10⁴倍増幅、これに対してPCRについては少なくとも20~25）及び酵素のより少い量の対応する使用が可能となる。第三に、蛋白質への翻訳、化学的不安定性のごとくRNAがDNAより好ましい任意の方法のために、多量のRNAが生産され得る。

T7RT法の最初の研究は前のセクションに記載したのと同じオリゴスクレオチド及び標的配列を使用した。図に示すように、各サイクルのために2種類の酵素、すなわちAMV逆転写酵素及びT7 RNAポリメラーゼが逐次使用される。変性、アーニーリング及び延長の反復される段階はサンプル温度の変化（変性のためには90~100°C、アーニーリングのためには37~41°C）、並びに増幅されるべき核酸、適当な緩衝液（酵素の供給者により示された）、NTP及びdNTP、モル過剰のオリ

特表平2-501532 (9)

ゴスクレオチドプライマー並びにRNアーゼ阻害剤を含有するサンプルへの酵素の添加により実現される。

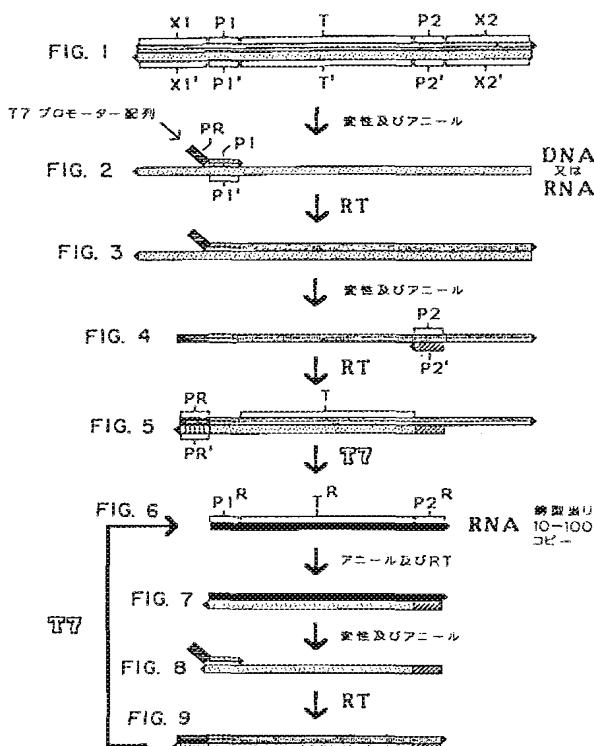
第一の実験において、プロモーター配列（上記のごとき）を含有するように最初に合成された遺伝子断片を使用してT7RT法の実施可能性を証明した。まず、基質DNAをT7 RNAポリメラーゼにより転写した。これは134ntのRNA生成物を生ずると予想された。次に、この材料を、放射能標識されたdNTPの存在下でAMV逆転写酵素を用いて、前記のようにそして図に示すようにして二本鎖DNAにもどした。予想され（そして得られた）主たるDNA生成物は134ntであり、インプット遺伝子断片の連続する存在のため151ntの少量の材料が存在した。T7ポリメラーゼを省略したほか、対照サンプルを同様に処理した。この逆転写酵素段階につづき、

AMVRTによる直接増幅の第二サイクルを各サンプルに対して行った。これは、プライマーとしてオリゴヌクレオチドを有する）を用いての134nt生成物の合成により151nt生成物の実質的な量の合成をもたらした。調節された反応の151nt生成物に比べて134nt物質は約10倍多かった（1回のT7RTサイクルの後）から、T7増幅は、PCR法のみの約4.5サイクルにより得られるそれに相当した。この増幅はT7RT法を最適化することなく達成されたから、PCR法に対する効率及びコストの一層大きな改良が期待される。

この明細書に記載したすべての公開及び特許出願は、この発明が属する分野における当業者のレベルを示すものである。

この明細書のすべての公表及び特許出願は、各個々の公開又は特許出願が引用により組み込まれるべき旨が示されているのと同じ程度に引用によりこの明細書に組み込まれる。

今やこの発明は十分に記載されており、添付された請求の範囲の本質又は範囲を逸脱することなく多くの変更を行うことができるることは当業者に明らかであろう。



国際調査報告書

International Application No. PCT/US88/02403

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if a patent classification is applied, indicate via "I")

Helping is International Patent Classification (IPC) or is both National Classification and IPC

INTL CL (4) C12Q 1/68

U.S. CL. 435/6

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched / Classification Groups

Classification System

435/6, 803, 91
U.S. 536/27, 935/78
436/501, 63

Documentation Searched after International Classification
is the latest that last Documentation is Searched in the following order:

Computer Searches: APS; Chemical Abstracts; BIOSIS; Derwent (WPI, WPI/L, Biotechnology)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Current: Change of Document, "n" with indication of type of document (see below) / Relevant to Claim No. V

Y US, A, 4,683,202 (MILLIS) 28 July 1987
see column 13, lines 27-41. 1-15

Y US, A, 4,683,195 (MILLIS ET AL.)
28 July 1987, see column 15, lines
58-68; column 17, lines 1-4 and 15-63. 1-15

Y Biochemistry, Volume 24, issued
09 October 1985 (Washington, D.C.)
U.S.A., Axelrod, V. D. et al.
"Transcription from Bacteriophage
T7 and SP6 RNA Polymerase Promoters
in the Presence of
3'-Deoxyribonucleoside
5'-Triphosphate Chain Termination",
see abstract page 3718. 1-15

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search
17 October 1988 Date of Filing of the International Search Report
01 DEC 1988

International Searching Authority
ISA/US Searcher's Signature
JEREMY S. JAY

Form PCT/ISA/27 Second Form (Rev.1/84)

第1頁の続き

⑤Int. CL. 9 識別記号 庁内整理番号
// C 12 P 21/00 C 8214-4B

⑥発明者 ブレテイー, フィリップ ジヤーク アメリカ合衆国, カリフォルニア 94025, メンロ パーク, サン

マテオ ドライブ 100

⑦発明者 ブースロイド, ジヨン チヤールズ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306, パロ アルト, ルーズ

ベルト サークル 42